

札幌医誌 57 (1) 59~66 (1988)

ヒトアデノウイルス 40 型左端 1.85 kb の構造と それに含まれる E1A 遺伝子の機能の解析

石 埜 正 穂

札幌医科大学がん研究所分子生物学講座 (主任 藤永 蕙 教授)

Analysis of Structure and Function of Human Adenovirus Type 40 Leftmost 1.85 kb Region Including Transforming E1 A Gene

Masaho ISHINO

*Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College
(Chief : Prof. K. Fujinaga)*

Nucleotide sequence of leftmost 1.85 kb of adenovirus type 40 (Ad40) DNA has been sequenced using cloned viral DNA fragments. Transacting function and transforming efficiency of Ad40 E1A gene which reside in this region have been assayed using established human and rat cell lines.

It was found that the inverted terminal repeat (ITR) of Ad40 which consists of repetitions of 8-50 nucleotides motifs of the Ad5 ITR (Ishino *et al.* Virology 156, 414-416; 1987), share a homology of 70-100% within each motif. In the E1A region, 27.5 kd polypeptide from the 13S-mRNA correspondent was deduced from the Ad40 DNA sequence analysis. Predicted Ad40 27.5 K retained the conserved domains of E1A. However, these sequence homologies of Ad40 compared to the well-defined types (Ad5, Ad7 and Ad12) are rather lower than those among the three well-defined types. Transforming efficiency of Ad40 E1A on 3Y1 cells was considerably lower than that of Ad12 E1A. Ad40 E1A transactivated an adenovirus early promoter, although the level of activation was rather low. It was also shown that Ad40 E1A promoter has only a little cis-acting activity as compared to the Ad12 promoter, especially in 3Y1 cells.

(Received October 26, 1987 and accepted November 27, 1987)

Key words: Human adenovirus type 40, Inverted terminal repeat, Adenovirus E1A,
Cell transformation, Transacting function

1 緒 言

ヒトアデノウイルス 40 型 (Ad40) は Ad41 とともに小児ウイルス性胃腸炎の病因ウイルスとして重要視されている。Ad40 は他のタイプのアデノウイルスと異なり通常の培養細胞での分離培養が困難である^{1,2,3)}が、Ad5 の E1 領域を含む 293 細胞⁴⁾ではある程度増殖可能なことが報告されている⁵⁾。しかしながら Ad40 の難増殖性への原因の一端をどの程度 E1A 遺伝子の機能的欠陥に帰せられるかは明らかにされていない⁶⁾。また E1 領域の一部若しくは全域を含むと考えられる Ad 40 左端 5-11% については、ラット細胞をトランスフォーム

する能力は持つが、その程度が他のタイプに比べてかなり弱いことが報告されている^{7,8)}。これらに対する興味から我々は E1 領域の構造と機能をより詳細に調べるため、千葉ら⁹⁾によって分離された Ad40 札幌株から最近クローニングされた各制限酵素切断 Ad40 DNA 断片⁹⁾のうち、i) 左端 5% に相当し ITR 及び E1 領域の一部を含むと考えられた F 断片の DNA 塩基配列を求め ii) その配列上から E1A 遺伝子領域を位置づけそこにコードされると考えられるペプチドのアミノ酸配列を推定し、さらに iii) Ad40 E1A 遺伝子の持つ *in vitro* での生理活性について調べ、これらについて他のタイプと比較し検討を行なった。

2 実験方法

2.1 塩基配列の決定

塩基配列の決定は基本的に Sanger の方法¹⁰⁾に従った。DNA 鎖伸長反応に必要な鋳型一本鎖 DNA の調整は Vieira and Messing (personal communication) が開発した pUC 118 vector を用いる方法に従った。まず塩基配列の決定及び recombinant 作成に供するため、Yanisch-Perron *et al.*¹¹⁾ の方法に準じて逐次欠失した DNA を持つプラスミドを作成した。Ad40 *Bam*HI-F 断片を正及び逆方向に組み込んだ p118F 及び p118FR を得、それぞれプライマーアニーリング部位の近傍で隣りあった部位を 2 種類の 1 カ所認識制限酵素により切断、直鎖状とした。2 種の制限酵素は組み込み断片側のみが 5' 突出末端となるように選び、ExoIII による継時的 DNA 消化を行った。次に ExoVII で一本鎖部分を消化した後、Klenow fragment により DNA 両端を平滑化し、T4 DNA ligase により両末端連結後、カルシウム処理 *E. coli* MV1304 に導入した。このなかから 200bp 程度ずつ逐次欠失した組み換えプラスミドを持つ大腸菌を選び出し、0.01%チアミン塩酸塩含有 2×TY 培地に接種後、ヘルパーファージ KO7 に感染させた。37℃で一晩振盪培養後培地中に出現したファージ粒子を 4%PEG, 0.5 M NaCl で沈澱させ、フェノール処理、エタノール沈澱で一本鎖プラスミドを回収後 TE(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解し RNaseA 処理を 37℃で 30 分行った。これらをプライマーにアニーリングしたのち 4 つに分け、それぞれ塩基特異的な chain-termination reaction を [α -³²P] dCTP 存在下で行なった。これらに 90℃で 30 分熱変性処理を施し、塩基配列解析用ゲル (7 M 尿素を含む 8%または 6%ポリアクリルアミドゲル、厚さ 0.3 mm) にのせ、1800-2000 V で電気泳動を行なった。ゲルは直接ラップフィルムで覆い、X 線フィルムを重ねてオートラジオグラフィーを行なった。

2.2 トランスフォーム活性の検出

それぞれの組み換え DNA をリン酸カルシウム法¹²⁾によって 3Y1 細胞に導入し、低 Ca²⁺ 培地で 3 週間培養後固定染色してフォーカス形成能を調べた。

2.3 chloramphenicol acetyl transferase (CAT)

発現による *in vitro* assay

トランスフェクションは DEAE-dextran 法^{13,14)} に依った。CAT 遺伝子を持つ組み換えプラスミドと E1A を含むプラスミド 6 μ g を 0.25 mg/ml DEAE, 50 mM Tris-HCl pH 7.4 含有培地 3 ml に溶解し細胞

の subconfluent monolayer 上加えた。37℃, 4 時間のインキュベーションの後グリセリン処理を施し、8% fetal calf serum を含む培地で 37℃, 48 hr 培養後細胞抽出液を回収、Gorman *et al.*¹⁵⁾ の方法により酵素活性を測定した。

3 実験成績

3.1 塩基配列の決定

継時的な ExoIII 反応により得られた一連のプラスミドを用い *Bam*HI-F 断片の全域にわたり両方鎖の塩基配列解析を行なうことができた。配列決定の過程 (sequencing strategy) を Fig. 1 に、決定した全塩基配列を Fig. 2 に示す。

3.2 ITR 領域のホモロジー

*Bam*HI-A 断片のクローン化 DNA を用い、ウイルスゲノム右端約 180 nucleotides (nt) の解析を行なった結果、F 断片の左端から 163 nt が A 断片の右端と一致し、inverted terminal repeat (ITR) を形成していることが確認されている¹⁶⁾。Ad 40 ITR は Ad 5 ITR¹⁷⁾ と塩基配列上特に類似性が高く、塩基番号 1-50 の比較では 82%のホモロジーを示した。また塩基番号 51-163 の部分も Ad5 ITR の塩基番号 51-103 の配列中の 8-21 nt からなるモチーフの繰り返し様構造を呈しており、それぞれのモチーフにおけるホモロジーは、70%-100%程度であった (Fig. 3)。

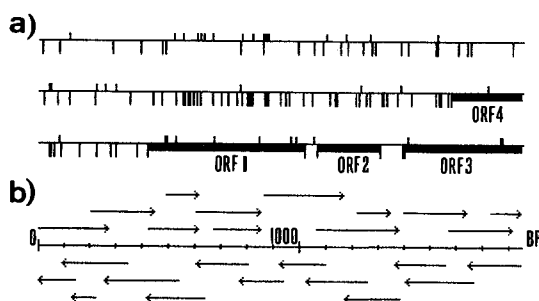


Fig. 1 Diagrams of open reading frames and strategy for DNA sequencing. a) The occurrence of initiation (ATG) and termination (TAG, TGA, TAA) codons on *r*-strand. The former are indicated by upward vertical lines and the latter by downward lines on each of three reading frames. The long termination codon-free stretches, ORF1-ORF4 are shown by thick bars. b) The regions sequenced using plasmids with a series of deletions are shown. Arrows indicate the direction and length of sequencing.

CATCATCAATAATATACCTTAAACTGGAACGAGCCAATATGATAATGAGGGAGGAGGACTAGGGGGTGGTGAAGATGACGTAGAGGC 90
 GGGCGTGGTGGGAAAGGGTGGAGGCGGATGACGTGTGGGGTCGGAGGCCGGGCGCGGTGCGGCGGAAGTGACGGAATAATTGGTGTATTG 180
 GCGGGTTTTTGCACATTTTGGCCATTTTGGCGGAAAACCTGAGTAATGAGGACGTGGGACGAACCTTTGGACTTTTGTGTTATGGAGGA 270
 AAAACTGCTGATTATTACTGAACTTTGGTCCATGACGAACCGGTTTTTCTACGTGGCAGTGCCACGAGACGGCTCAAAAGTCCTAATTTTT 360
 TATTGTGTGCTCAGCCCGTTTGAGGGTATTATAACACAGCCAGAACATCAAGAGGCCACTCTTGAGTGGCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCT 450
 CCATTGCTGTTGGCGCTTTGACATAGCCGTCAGATGAGAATGCTGCCGGATTTTTTACCAGGAACTGGGATGACATGTTCCAGGGGT 540
 M R M L P D F F T G N W D D M F Q G L
 TGCTGGAGACTGAATATGTGTTGATTTCCTGAACCTTCTGAGGCTTCTGAAGAAATATCGCTTATGATCTTTTGTATGTGGAGGTGG 630
 L E T E Y V F D F P E P S E A S E E I S L H D L F D V E V D
 ATGGTTTCGAAGAGGACGCCAACCCAGGAAGCGGTTGATGGTATGTTTCCCGAGAGGTTGCTGTCCGAGGCTGAGAGCGCTGCAGAGAGGC 720
 G F E E D A N Q E A V D G M F P E R L L S E A E S A A E S G
 GTTCGGGTGATTCTGGGGTGGCGAAGAGTTGTTGCCGTTGATCTGGATTGAAATGCTATGAAGACGGTTGCTCTCTAGCGATCCG 810
 S G D S G V G E L L P V D L D L K C Y E D G L P P S D P E
 AAACTGATGAGGCTACAGAAGCGGAAGAAGAGCGGCTATGCCGACTTATGTGAATGAAATGAAATGAGCTGGTGTGGACTGTCCAG 900
 T D E A T E A E E E A A M P T Y V N E N E N E L V L D C P E
 AGAACCTTGGGCGAGGTTGTCGGGCTTGTGATTTCATCGGGGCACTAGTGGCAATCCCTGAAGCTATGTGTCTTGTGTTATATGCGTT 990
 N P G R G C R A C D F H R G T S G N P E A M C A L C Y M R L
 TAACTGGACACTGTATCTACAGTAAGTAAAGTATTTTATTGTTGTTGGTGTGTTGGTTAATATGAACAAGAGTTAACGACTTTTTGTGA 1080
 T G H C I Y S
 TTTTAGGTCCAAATTCAGATGCGGAAGGGGAGTCTGAGTCCGGGGTCGCTGAGGACACTGATTTTCCCCACCCCTTAACCGCCACGCCGC 1170
 P I S D A E G E S E S G S P E D T D F P H P L T A T P P
 CACATGGAATGTAAGAACCACCCCGTCGAGAGTTTCTGTAGACGACGCCAGCTGTTGAATGCATAGAAGATTACTTGAGGAAGATC 1260
 H G I V R T T P C R V S C R R R P A V E C I E D L L E E D P
 CAACAGATGAACCTTTGAACCTGTCTCTAAAGCGCCCAAGTGCTCCTGAGATTATAGTATAAAGTTATTGACCCCTTACCTGTGTTA 1350
 T D E P L N L S L K R P K C S
 TTTCTTGGCGTGTTTGTGGGCTATATAAGCAGGTAGAATGGTTTAGTGTTAGTTTATTCTGATGGAGTTGTGGAGTGAAGTACAAAGTT 1440
 M E L W S E L Q S Y
 ATCAAAACCTCCGACGCTTGCTGGAGTTGGCTTCTGCCAGAACTTCCAGCTGTTGGAGAATCCTTTTGGCTCAACTTTAGCTAATGTGA 1530
 Q N L R R L L E L A S A R T S S C W R I L F G S T L A N V I
 TTTATAGAGCTAAGGAGGAGTACTCTTCGCGGTTTGCTGACCTTTTGTGCGATAACCTGGAATTTTGTCTCTTGAATTGGGGCATC 1620
 Y R A K E E Y S S R F A D L L S H N P G I F A S L N L G H H
 ACTCATTTTTCAAGAAATTTGATCAGAAATTTAGATTTTCTTCTCTGCGGCTACGGTTTCTGGGCTTGCTTTTATTGTTTATAT 1710
 S F F Q E I V I R N L D F S S P G R T V S G L A F I C F I L
 TGGATCAATGGAGCGCCAACTCATCTGTGCGAGGGTTATCTCTGGATTACATGGCAATGGCTCTGTGGAGAACCTTGCTACGGAGGA 1800
 D Q W S A Q T H L S Q G Y T L D Y M A M A L W R T L L R R K
 M E R P N S S V A G L Y S G L H G N G S V E N L A T E E
 AGAGGGTCTTAGGTTGCTTGGCGGCGCAGGTCCGACGGTTTGGATCC
 R V L G C L P A H G P H G L D
 E G L R L L A G A R S A R F G S

Fig. 2 Sequence of the Ad40 *Bam*HI-F fragment. The entire sequence of the *Bam*HI-F fragment containing ITR, E1A and a part of E1B genes is shown. CAAT box, TATA box and AATAAA sequences are boxed. Analogues of enhancer core repeats are underlined. Presumptive site of initiation of transcription is indicated by an arrow. Tentative coding sequences are translated.

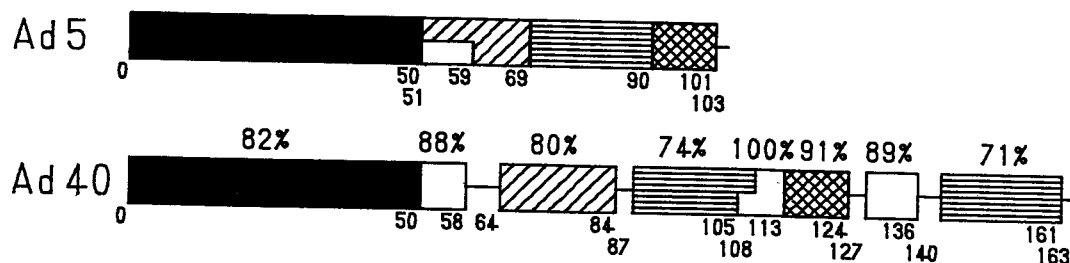


Fig. 3 Rearranged homology of the Ad40 ITR with the Ad5 ITR. Each box represents highly homologous regions between Ad5 and Ad40 ITR. The percentage of identical base nucleotide within each region is shown. Thin lines are non-homologous sequences. Numbers under the bars indicate nucleotide positions.

3.3 シグナル配列とコード領域の推定

Ad5, Ad7 及び Ad12^{18,19,20,21,22,23,24)} との類似性を参考にしながら DNA 配列から転写信号及び、翻訳領域を推定した。ウイルス左端の C 残基を塩基番号 1 とすると、塩基番号 387 に Ad7 や Ad12 と同一な TATA box, TATTTAA が見出された。TATA box から 60-70 nt 下流に至る cap 部位を含む領域は、タイプ間での保存性が高い。Ad40 においてもこの部分に高い一見性が見られた。E1A の CAAT box のコンセンサス配列 TCAAAG は Ad40 においても、配列上から推定された cap 部位 (塩基番号 418) から 74 nt 上流に見出された。一方 Hearing and Shenk²⁵⁾ によって報告されたエンハンサーコア繰り返し配列は指摘されている部位 (cap より-200 及び-300 上流) に見出されなかったが、-188 及び-265 にそれぞれコア配列に類似した配列 AGGACGTGGGA 及び CGGAAGTGACG が存在していた。推定 cap 部位下流に現れる最初の ATG は、ORF1 (open reading frame 1, Fig. 1) の左端に位置していた。いままで知られている E1A では、2 種類のスプライシングを受けて ORF1 から ORF2 にコード領域がまたがり、例えば Ad2 や Ad5 では 12S 並びに 13S mRNA を形成する。Ad40 においても、12S 及び 13S mRNA に相当するものを形成することが可能なスプライシングドナー (それぞれ塩基番号 926, TT/GTGATT 及び塩基番号 1010, CA/GTAAGT) 並びにアクセプター (塩基番号 1081, TTTTAG/GT) を、配列の相同性及び結果的にコードされるアミノ酸配列の相同性から容易に推定することができた。13S mRNA 産物に相当する Ad40 の E1A 推定産物の分子量は 27.5 K であり、Ad5 の 31.7 K や Ad12 の 29.7 K に比してやや小さめであった。推定されるコード領域における終止コドン (TGA) は塩基番号 1308 に現れ、さらにその 10 nt 下流に polyA シグナルと考えられる AATAAA が存在していた。また塩基番号 1372 に存在する TATATAA は E1B の TATA box と考えられ、塩基番号 1413 及び 1718 の ATG から E1B の 2 種類の蛋白

がそれぞれコードされていると推定された。

3.4 推定アミノ酸配列のホモロジー

Ad40 E1A の推定 27.5 Kd 蛋白のアミノ酸配列を他のタイプの相当する蛋白と比較した。E1A 領域全体のホモロジーは、Ad5 と Ad12 の間で 44% なのに対し、Ad40 は Ad5 に対し 40%, Ad12 に対し 39% とやや低めながら総じて他のタイプとの高い類似性を示した。

部分的なホモロジーでみると、他のタイプとの類似性の高い部分は、過去の報告において E1A のいくつかの独立した機能のうち一つまたは幾つかを担うとして指摘された部位²⁶⁾ とだいたい一致していることが示された (Fig. 4)。

3.5 3Y1 細胞のトランスフォーメーション及び CAT 発現アッセイ

Ad40 E1A を含む p40FP の 3Y1 に対するフォーカス形成能は、Ad12 の E1A を含む p12AccH (Fig. 5) に比べて極端に低いことが分かった (Table 1)。一方 E1A によるトランス型活性化能を、アデノウイルス E2 プロモーターに CAT 遺伝子を連結した pEC²⁷⁾ とクロン化 E1A 遺伝子を用いて、HeLa 細胞を場とした co-transfection 法により調べた。Ad40 E1A はトランス型活性化能が弱く、pEC の活性化レベルは Ad12 の場合の 30% 程度であることが示された (Fig. 6 lane 1-4)。次に E1A プロモーターのシス型活性化の強さを調べた。Ad40 及び Ad12 の E1A プロモーター下に CAT 遺伝子を接続した組み換え体 p40CAT 及び p12CAT を作成 (Fig. 5) し、HeLa 細胞にトランスフェクションしたところ p40CAT は p12CAT の約 50% の発現を示した (Fig. 6 lane 5, 6)。このように HeLa 細胞での一連の実験では Ad40 のシス及びトランス型活性能が Ad12 に比べ弱い傾向にあることが示されたが、3Y1 細胞における同様の実験ではその傾向が更に著しく、3Y1 細胞では、pEC のトランス型活性化で見ると Ad40 は Ad12 の 20%, または E1A プロモーターによるシス型活性化で見ると p40CAT は p12CAT の 6-7% の活性しか示さなかった (Fig. 7)。

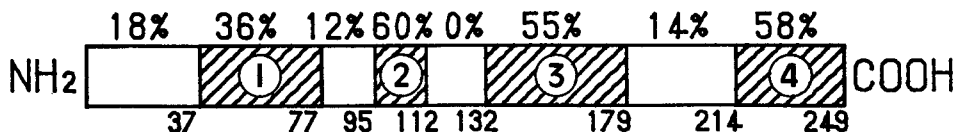


Fig. 4 Regional homologies of Ad40 249 amino acid E1A compared to Ad5 289 amino acid E1A. Conserved regions are indicated by cross hatching and circled numbers. Amino acid position numbers and percentage of identical amino acids in each region are shown below and above the bar, respectively. 1-3 are regions tentatively assigned for special functions by Moran and Mathews²⁷⁾.

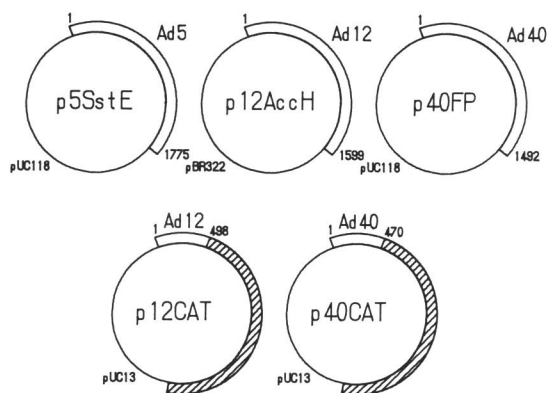


Fig. 5 Structure of recombinant plasmids. p5SstE, p12AccH and p40FP contains the 1775, 1599 and 1492 left-most nucleotides of Ad5, Ad12 and Ad40, respectively. p12CAT and p40CAT contains E1A promoter region (positions 1 to 498 and 1 to 470, respectively) connected to CAT coding region of pUCCAT (provided by Dr. R. Kingston), which carries CAT gene with SV40 small T splicing and poly(A) addition signals (hatched box). Numbers indicate nucleotide positions on adenoviral DNAs.

4 考 察

腸管アデノウイルス (EAd) は、DNA 配列及び抗原性の相違から Ad40 と Ad41 に分類され、従来のアデノウイルス A-E グループのいずれにも属さない。この中でも Ad40 は様々な培養細胞において特に増殖し難い³⁾ こと、またげっ歯類細胞に対するトランスフォーム活性が極めて低い^{7,8)} ことなど、アデノウイルスの各タイプのなかでも特異な性質を持っている。今回、Ad40 の ITR 及び E1A 領域を解析した結果、ITR については、ウイルス複製時重要な役割を果たしている²⁸⁾ にも拘らず、配列上からは特にこれらの事実の原因となり得るような特徴を見出すことが出来なかった。一方 E1A においては、いくつかの特徴的な性質が見出された。特

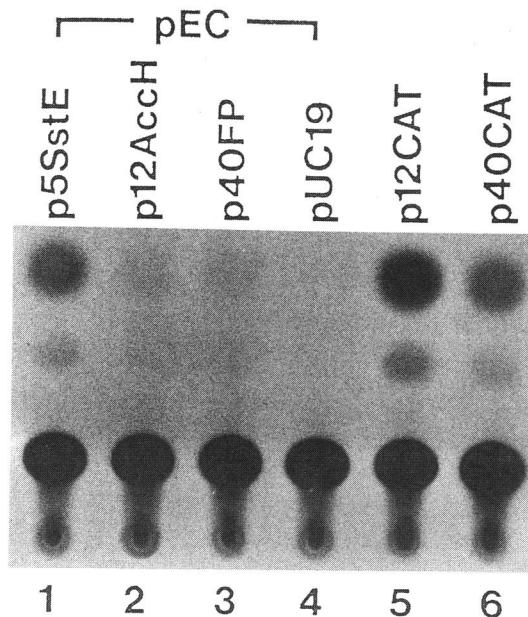


Fig. 6 CAT activity in HeLa cells. Transfection of pEC (lane 1-4) in the presence of E1A containing plasmid: p5SstE (lane 1), p12AccH (lane 2), p40FP (lane 3) and in the absence of E1A: pUC19 (lane 4). Transfection of p12CAT (lane 5) and p40CAT (lane 6).

に今回は、Ad40 の E1A 単独で形態的トランスフォーメーションを起こし得ることが示された一方、それが非常に弱いものであることが確認された。このことは推定アミノ酸配列からの情報とも一致している。即ち、最近トランスフォームの誘導に重要であることが指摘されつつある region 1 (Fig. 4) におけるアミノ酸配列のホモロジーをみると、例えば Ad5 と Ad7 は 63%、Ad5 と Ad12 は 52% という値であるのに対し、Ad40 については、Ad5、Ad7 及び Ad12 に対してそれぞれ 36%、45% 及び 36% というように、他のタイプとのホ

Table 1 Transformation of a rat cell line 3Y1 by cloned adenovirus E1A.

DNA transfected	number of foci/4 dishes				
	Exp. I ^{a)}	Exp. II ^{b)}	Exp. III ^{c)}	Exp. IV ^{d)}	Exp. V ^{e)}
p12AccH	24	406	262	163	218
p40FP	3	0	4	2	6
pUC19	0	0	0	0	0

a) 3 μ g DNA b) 20 μ g DNA c) 4 μ g DNA and 16 μ g carrier DNA

d) 12 μ g DNA and 8 μ g carrier DNA e) 20 μ g DNA

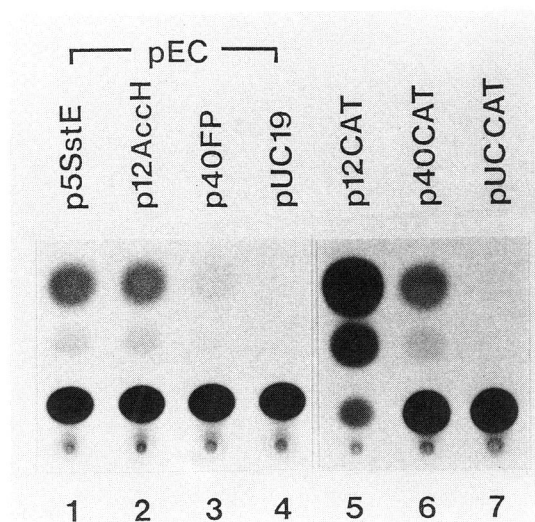


Fig. 7 CAT activity in 3Y1 cells. Co-transfection of pEC with p5SstE (lane 1), p12AccH (lane 2), p40FP (lane 3) and pUC19 (lane 4). Transfection of p12CAT (lane 5), p40CAT (lane 6) and pUCCAT (lane 7).

モロジーが特に低い。これと同じ region 1 に在るとされる DNA 合成誘導能²⁶⁾との兼合いは興味あるところである。一方 E1A による他のウイルス初期遺伝子のトランス型活性化は region 3 のみに依存するとされる^{29,30,31)}。この部分でも配列上 Ad40 と他のタイプ (Ad5, Ad7, Ad12) とのホモロジー (49~55%) は他のタイプ同士のそれ (59~65%) に比べて低めであり、アデノウイルス初期プロモーターの活性性能も Ad5 や Ad12 の E1A に比べ低い値を示す傾向にあった。このほか注目すべきなのは E1A プロモーターによるシス型活性化を見た結果であろう。Ad40 E1A プロモーターは Ad12 と比べて、特に 3Y1 細胞で著しく低いシス型活性性能を示した。E1A エンハンサーが E1A, E1B など重要な初期領域の遺伝子発現³²⁾その他に深く関与していることを考えると、シス型活性化能の弱さが Ad40 の難増殖性の原因の一端となっている可能性は否定できない。培養細胞中での Ad1 や Ad5 などとの混合感染や、293 細胞への感染⁹⁾によっても Ad40 の難増殖性が一般にあまり回復されないことから、ゲノム上の配列のシス型に働く機能に難増殖性に関わる何等かの特徴が存在する可能性を考えるのは妥当と思える。Ad40 に限らず Rotavirus 等下痢症ウイルスは一般の培養細胞で増えにくいことが知られている。Ad40 の腸管ウイルスとしての感染過程において、Ad40 E1A 遺伝子で今回見られたような特徴がどのように関連を持つのか、ま

たそれらが他の腸管ウイルスの性質と何らかの接点を持つのか否か、更に研究を要するところである。

5 結 論

腸管アデノウイルス Ad 40 ゲノム左端 1.85 kb の塩基配列をクローン化 DNA を用いて明らかにし、さらに E1A 遺伝子の持つ *in vitro* での生理活性を調べ以下の結果を得た。

- 1) Ad40 E1A 領域からは Ad5 E1A 13S 産物に相当するものとして 27.5 Kd のポリペプチドが DNA 配列より推定される。
- 2) 推定 27.5 K のアミノ酸配列を他のタイプと比較すると、E1A の諸機能を担うと指摘されている部分は Ad40 においても保存されているが、そのホモロジーの度合いは他のタイプ間で見られるものより低い。
- 3) 3Y1 細胞を場とした場合、Ad40 E1A は Ad12 E1A に比べトランス型活性がかなり弱い。
- 4) Ad40 E1A の初期プロモーターに対するトランス型活性化能は Ad12 より低い。
- 5) E1A プロモーターのシス型活性化能を比べると、特に 3Y1 細胞中において Ad40 は Ad12 より際立って低い。

稿を終えるにあたり、終始御親切な御指導と御校閲を賜りました藤永憲教授に深謝いたします。また、多くの御教示をいただいた本学小児科学講座千葉峻三教授に厚く御礼申し上げますとともに、本研究の遂行にあたり御協力下さった本学分子生物学教室の方々に感謝の意を表します。

尚、本研究の一部は文部省科学研究助成金 (藤永) により行なわれた。

文 献

1. Johansson, M. E., Uhnöo, I., Kidd, A. H., Madeley, C. R., and Wadell, G.: Direct identification of enteric adenovirus, a candidate new serotype associated with infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **12**, 95-100 (1980).
2. de Jong, J. C., Wigand, R., Kidd, A. H., Wadell, G., Kapsenberg, J. G., Muzeric, C. J., Wermenbol, A. G., and Firtzlaff, R. G.: Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J. Med. Virol.* **11**, 215-331 (1983).
3. van Loon, A. E., Rozijn, T. H., de Jong J. C., and Sussenbach, J. S.: Physicochemical prop-

- erties of the DNAs of the fastidious adenovirus species 40 and 41. *Virology* **140**, 197-200 (1985).
4. Graham, F. L., Simely, J., Russel, W. C., and Narin, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-72 (1977).
 5. 荒木和子: 培養細胞における腸管アデノウイルスの分離に関する研究. *ウイルス* **36**, 273-282 (1986).
 6. Takiff, H. E., and Straus, S. E.: Early replicative block prevents the efficient growth of fastidious diarrhea-associated adenoviruses in cell culture. *J. Med. Virol.* **9**, 93-100 (1982).
 7. Van Loon, A. E., Maas, R., Vaessen, R. T. M. J., Reemst, A. M. C. B., Sussenbach, J. S., and Rozijn, Th. H.: Cell transformation by the left terminal regions of the adenovirus 40 and 41 genomes. *Virology* **147**, 227-230 (1985).
 8. 出村 守, 沢田幸治, 吉田幸一: ヒトアデノウイルス F 群 40 型 (札幌株) ゲノムのクローニング, 制限酵素切断地図の作成及びトランスホーム遺伝子の同定. *札幌医誌* **56**, 57-69 (1987).
 9. Chiba, S., Nakata, S., Nakamura, I., Taniguchi, K., Urasawa, S., Fujinaga, K., and Nakao, T.: Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. *Lancet* **2**, 954-957 (1983).
 10. Sanger, F.: Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**, 1205-1210 (1981).
 11. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119 (1985).
 12. van der Eb, A. J., and Graham, F. L.: Assay of transforming activity of tumor virus DNA. *Methods Enzymol.* **65**, 826-839 (1980).
 13. Sompayrac, L. M., and Danna, K. J.: Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7575-7578 (1981).
 14. Lopata, M. A., Cleveland, D. W., and Sollner-Webb, B.: High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5707-5717 (1984).
 15. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1044-1051 (1982).
 16. Ishino, M., Sawada, Y., Yaegashi, T., Demura, M., and Fujinaga, K.: Nucleotide sequence of the adenovirus type 40 inverted repeat: close relation to that of adenovirus type 5. *Virology* **156**, 414-416 (1987).
 17. Steenbergh, P. H., Maat, J., van Ormondt, H., and Sussenbach, J. S.: The nucleotide sequence at the termini of adenovirus 5 DNA. *Nucleic Acids Res.* **4**, 4371-4390 (1977).
 18. Gingeras, T. R., Sciaky, D., Gelinis, R. E., Bing-Dong, J., Yen, C. E., Kelly, M. M., Bullock, P. A., Parsons, B. L., O'Neill, K. E., and Roberts, R. J.: Nucleotide sequences from the adenovirus-2 genome. *J. Biol. Chem.* **257**, 13475-13491 (1982).
 19. Perricaudet, M., Akusjarvi, G., Virtanen, A., and Pettersson, U.: Structure of two spliced mRNA's from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature* **281**, 694-696 (1979).
 20. Bos, J. L., Polder, L. J., Bernards, R., Schrier, P. I., van den Elsen, P., van der Eb, A. J., van der Ormondt, H.: The 2.2 kb mRNA of human Ad 12 and Ad 5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplates. *Cell* **27**, 121-131 (1981).
 21. Dijkema, R., Dekker, B. M. M., and van Ormondt, H.: Gene organization of the transforming region of adenovirus type 7. *Gene* **18**, 143-156, (1982).
 22. Yoshida, K., and Fujinaga, K.: The nucleotide sequences of the transforming HindIII-I·J fragment of adenovirus type 7 DNA. *Tumor Res.* **19**, 39-47 (1984).
 23. Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., Uesugi, S., and Fujinaga, K.: Structure and gene organization in the transforming HindIII-G fragment of adenovirus type 12. *Cell* **20**, 777-786 (1980).
 24. Kimura, T., Sawada, Y., Shinagawa, M., Shimizu, Y., Shiroki, K., Shimojo, H., Sugisaki, H., Takanami, M., Uemizu, Y., and Fujinaga, K.: Nucleotide sequence of the transforming early region 1 B of adenovirus type 12 DNA: structure and gene organization and comparison with those of adenovirus type 5 DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6571-6589 (1981).
 25. Hearing, P., and Shenk, T.: The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* **33**, 695-703 (1983).
 26. Moran, E., and Mathews, M. B.: Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. *Cell*

- 48, 177-178 (1987).
27. Imperiale, M. J., Hart, R. P., and Nevins, J. R.: An enhancer-like element in the adenovirus E2 promoter contains sequences essential for uninduced and E1A-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 381-385 (1985).
28. Guggenheimer, R. A., Stillman, B. W., Nagata, K., Tamanoi, F., and Hurwitz, J.: DNA sequences required for *in vitro* replication of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3069-3073 (1984).
29. Moran, E., Grodzicker, T., Roberts, R. J., Mathews, M. B., and Zerler, B.: Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J. Virol.* **57**, 765-775 (1986).
30. Glenn, G. M., and Ricciardi, R. P.: Adenovirus 5 early region 1A host range mutants hr 3, hr 4, and hr 5 contain point mutations which generate single amino acid substitutions. *J. Virol.* **56**, 66-74 (1985).
31. Lillie, J. W., Green, M., and Green, M. R.: An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell* **46**, 1043-1051 (1986).
32. Hearing, P., and Shenk, T.: The adenovirus type 5 E1A enhancer contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates all early units in cis. *Cell* **45**, 229-236 (1986).
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学がん研究所分子生物学講座 石埜正穂